

研究报告



灵芝尿嘧啶营养缺陷型菌株的筛选和分子鉴定

周陈力 万佳宁 卢绪志 茅文俊 唐利华 吴莹莹 鲍大鹏*

上海市农业科学院食用菌研究所 农业部南方食用菌资源利用重点实验室 国家食用菌工程技术研究中心
上海市农业遗传育种重点开放实验室 上海 201403

摘要:【背景】营养缺陷型是一种应用广泛的分子标记,但是目前在灵芝中还未有研究和应用报道。【目的】为灵芝遗传转化研究、杂交育种和菌种鉴别提供亲本材料和技术支持。【方法】采用紫外光诱变、单单杂交、孢子单核化的方法从灵芝单核体菌株出发得到尿嘧啶营养缺陷型双核体菌株。【结果】获得8株稳定的尿嘧啶营养缺陷型单核体突变菌株和7株尿嘧啶营养缺陷型双核体菌株。【结论】灵芝尿嘧啶营养缺陷型菌株在添加外源营养物的基础上可恢复正常生长,可以为灵芝遗传转化体系的构建和灵芝育种提供材料。

关键词: 灵芝, 5-氟乳清酸, 尿嘧啶营养缺陷型, 双核体

Screening and molecular verification of uracil auxotrophic mutants of *Ganoderma lucidum*

ZHOU Chen-Li WAN Jia-Ning LU Xu-Zhi MAO Wen-Jun TANG Li-Hua
WU Ying-Ying BAO Da-Peng*

Institute of Edible Fungi, Shanghai Academy of Agricultural Sciences; Key Laboratory of Applied Mycological Resources and Utilization, Ministry of Agriculture; National Engineering Research Center of Edible Fungi; Shanghai Key Laboratory of Agricultural Genetics and Breeding of Shanghai, Shanghai 201403, China

Abstract: [Background] Auxotrophy is a widely applied biomarker in production and scientific research, but there is no report on *Ganoderma lucidum*. [Objective] This study was conducted to provide parent strains and technique supports for genetics research, cross breeding and spawn identification of *Ganoderma lucidum*. [Methods] The uracil auxotrophic mutant strains were obtained by UV mutagenesis of protoplast. The randomly selected uracil auxotrophic monokaryon strains were used as parents, and crossed with each other by Monokaryon-monokaryon mating to establish uracil auxotrophic dikaryons. [Results] Eight uracil auxotrophic mutant strains were obtained by UV mutagenesis of protoplast. Seven uracil auxotrophic dikaryon strains were obtained by Monokaryon-monokaryon crossing. [Conclusion] The testing results showed these auxotrophic strains restored their growth on PDA medium with uracil. The

Foundation items: STCSM Applied Technology Development Program (17391900400); Shanghai Engineering Research Center of Edible Fungi (16DZ2281300)

*Corresponding author: Tel: 86-21-62200794; E-mail: 1610301025@qq.com

Received: 17-10-2018; Accepted: 19-02-2019; Published online: 02-04-2019

基金项目: 重要食药菌种质资源库和基因组数据库的构建(17391900400); 上海市科学技术委员会工程技术研究中心能力提升项目(16DZ2281300)

*通信作者: Tel: 021-62200794; E-mail: 1610301025@qq.com

收稿日期: 2018-10-17; 接受日期: 2019-02-19; 网络首发日期: 2019-04-02

uracil auxotrophic dikaryon strains would be used as a tool for genetic transformation study and breeding.

Keywords: *Ganoderma lucidum*, 5'-Fluoro-orotic acid, Uracil auxotroph, Dikaryon

灵芝[*Ganoderma lucidum* (Curtis:Fr.) P.Karst] 是中国传统的食药菌, 含有多糖、三萜类化合物、核苷类、氨基酸、麦角甾醇、生物碱等多种生物活性成分^[1]。近年来对灵芝药理学和临床应用等多方面的研究证实, 灵芝多糖具有降血糖、促进肠道黏膜免疫系统的免疫功能、提高抗氧化能力、延缓衰老、保肝、促进睡眠等功效^[2-5]。活性物质灵芝多糖和三萜类化合物等对前列腺癌有较好的抑制作用^[6]。灵芝全粉具有抑菌和抗氧化作用^[7]。

灵芝遗传转化中应用的筛选标记主要有两类: 一类是抗生素抗性基因, 如 *kan* 基因(遗传霉素抗性基因)^[8]、*hpt* 基因(潮霉素磷酸转移酶)^[9-12]、*neo* 基因(新霉素磷酸转移酶 II)^[13]; 另一类是除草剂抗性基因, 如 *bar* 基因(草丁膦-N-乙酰转移酶)^[8,14]。在获得转化子后, 这些筛选标记在多数情况下是多余的, 存在发生水平转移和基因逃逸的可能性, 从而产生毒理学和生态学风险^[15-16]。在生长发育过程中, 这些筛选标记的存在可能导致原有基因或外源基因沉默, 甚至影响二次转化^[17]。

在食用菌基因转化中较理想的安全选择性标记基因是营养缺陷型标记基因。营养缺陷型标记基因来自于宿主本身, 属于同源转化, 避免了甲基化^[18]。尿嘧啶营养缺陷型是一种在微生物中常用的营养缺陷型标记。目前尿嘧啶合成代谢路径已经研究的非常清楚。5-氟乳清酸(5'-Fluoro-orotic acid, 5-FOA)是尿嘧啶合成途径中乳清酸核苷酸的底物类似物, 能转化为有很强细胞毒性的 5-氟尿嘧啶核苷酸, 抑制野生型菌株的生长^[19]。参与尿嘧啶从头合成反应的两个关键酶编码基因 *pyrF* 和 *pyrG* 发生突变后尿嘧啶的合成途径被打断, 尿嘧啶营养缺陷型菌株不能代谢有毒的 5-氟尿嘧啶核苷酸, 从而获得 5-FOA 抗性。在灵芝的遗传研究

中, 全基因组测序已经完成^[20], 这为灵芝尿嘧啶营养缺陷型的分子鉴定和分子标记提供了基础。

本研究通过紫外诱变获得灵芝尿嘧啶营养缺陷型的单核体菌株, 并对缺陷型菌株的 *pyrF* 和 *pyrG* 基因进行了分子鉴定。这些尿嘧啶营养缺陷型单核体菌株在不含尿嘧啶的基本培养基中无法正常生长, 在此基础上运用杂交方法培育出尿嘧啶营养缺陷型的灵芝双核体菌株, 为进一步开展灵芝遗传育种和菌种鉴别研究提供了技术路线和试验材料。

1 材料与方法

1.1 菌株、主要试剂和仪器

野生型灵芝单核体菌株 80 (交配型为 *A1B1*)、野生型灵芝单核体菌株 214 (交配型为 *A2B2*)均由本实验室从灵芝野生型双核体菌株沪农灵芝 1 号分离得到, 沪农灵芝 1 号由上海市农业科学院食用菌研究所菌种保藏中心提供。

马铃薯培养基和马铃薯葡萄糖液体培养基, BD 公司; 溶壁酶, 广东省微生物研究所; 原生质体制备和 DNA 提取所需试剂, 国药(上海)公司。离心机, Eppendorf 公司; 摇床, 上海智诚分析仪器制造有限公司; PCR 仪, Bio-Rad 公司。

1.2 培养基

马铃薯培养基(PDA): PDA 粉末 39.0 g 溶于 1 L 蒸馏水中。尿嘧啶马铃薯培养基(PDAU): 在 PDA 培养基中添加尿嘧啶 0.005 6 g/L。筛选马铃薯培养基(PDAUF): 在 PDA 培养基中添加尿嘧啶 0.005 6 g/L 及 5-FOA 0.5 g/L。马铃薯葡萄糖液体培养基(PD): PDB 粉末 24.0 g 溶于 1 L 蒸馏水中。原生质体再生培养基(PDMS)的配制参考文献[21]。添加尿嘧啶原生质体再生培养基(PDMSU): 在 PDMS 培养基中添加尿嘧啶 0.005 6 g/L。原生质体再生筛选培养基(PDMSUF): 在 PDMS 培养基中添加尿嘧啶 0.005 6 g/L 及 5-FOA 0.5 g/L。基本培养基

(MM)的配制参考文献[21]。尿嘧啶基本培养基(MMU): 在基本培养基中添加尿嘧啶0.005 6 g/L。筛选基本培养基(MMUF): 在基本培养基中添加尿嘧啶0.005 6 g/L及5-FOA 0.5 g/L。木屑培养基: 木屑78%, 麦麸20%, 石膏1%, 蔗糖1%, 含水量为60%–65%, 1×10^5 Pa灭菌2 h。

1.3 灵芝原生质体细胞紫外致死试验

将野生型灵芝单核体菌株80接种于PD培养基中, 25 °C培养7 d后过滤收集菌丝, 用蒸馏水冲洗数次, 再用0.6 mol/L甘露醇冲洗, 加入2%的溶壁酶, 30 °C、65 r/min条件下酶解4 h。用砂芯漏斗过滤酶解液, 滤液在4 °C、3 000 r/min离心10 min, 弃上清, 用0.6 mol/L甘露醇重悬, 再次离心, 弃上清, 此步骤重复1–2次。最后在原生质体细胞沉淀中加入适量的0.6 mol/L甘露醇混匀, 用血球计数板计数并计算原生质体密度^[22]。将原生质体细胞稀释到 10^4 个/mL, 取100 μ L均匀涂布到PDMS平板培养基上, 以功率为62.5 mJ的紫外光垂直照射(距离15 cm)平板表面, 照射时间分别为0、5、10、15、20、25、30 s, 3次重复。25 °C下避光培养14 d后, 观察原生质体细胞再生情况, 记录再生菌落数目。

1.4 灵芝原生质体紫外诱变与营养缺陷型突变株的筛选验证

将原生质体细胞稀释到 10^4 个/mL, 取100 μ L原生质体细胞溶液, 分别涂布到PDMS、PDMSU、PDMSUF平板培养基上。以功率为62.5 mJ的紫外光垂直照射(距离15 cm)涂布后的PDMSUF平板, 涂布后的PDMS、PDMSU不照射作为对照。25 °C避光培养14 d, 观察萌发情况。挑取PDMSUF平板上萌发的单菌落转接到PDAUF平板培养基上, 25 °C培养7 d后, 挑取边缘菌丝体接种于PDAU培养基上进行培养, 如此重复5次后, 放在显微镜上检查, 挑出无锁状联合的菌丝体备用, 淘汰有锁状联合的菌丝体。将无锁状联合的菌丝体接种于不同培养基MM、MMU、MMUF, 进行表型验证培养, 同时以正常菌株作为对照, 重复3次。

25 °C培养7 d, 挑选出能在MMU和MMUF上生长但在MM上不生长的单孢子, 即为尿嘧啶营养缺陷型单孢萌发菌株。

1.5 灵芝尿嘧啶营养缺陷型菌株基因组DNA的提取与PCR克隆相关基因

用CTAB法^[23]提取灵芝尿嘧啶营养缺陷型菌株基因组DNA。根据灵芝*pyrF*和*pyrG*基因设计分子标记引物(表1)。PCR反应体系(50 μ L): *ExTaq* (5 U/ μ L) 0.5 μ L, 10 \times *ExTaq* buffer (Mg^{2+} Plus) 5 μ L, dNTP mixture (2.5 mmol/L) 4 μ L, 模板DNA (100 ng/ μ L) 1 μ L, 正、反向引物(10 μ mol/L)各1 μ L, ddH₂O 37.5 μ L。PCR反应条件: 94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 2 min, 35个循环; 72 °C 10 min; 4 °C保藏。

1.6 出菇

将灵芝尿嘧啶营养缺陷型单核体菌株80-2、80-3和80-108 (*A1B1*)分别与可亲和的野生型单核体菌株214 (*A2B2*)杂交, 得到3株杂交菌株SLN2、SLN3和SLN8 (交配型均为*A1B1*+*A2B2*), 进行出菇试验。

1.7 灵芝的单孢分离及单核菌丝群体的建立与鉴定

双核体菌株SLN2、SLN3出菇后收集自然弹射的孢子。将收集到的孢子放入装有无菌水的EP管中制备孢子悬液, 血球计数板计数后再用无菌水稀释到 10^4 个/mL。取100 μ L孢子液涂布到PDAUF培养基上, 于25 °C生化培养箱内倒置培养, 一般7 d内可见到孢子萌发的菌丝体。将孢子萌发的菌丝体转接到PDAU培养基上, 培养7 d后再挑边缘菌丝体于新的PDAU培养基上, 如此重

表1 扩增*pyrF*和*pyrG*基因的PCR引物

Table 1 The primers to amplify *pyrF* and *pyrG* genes

基因名称	引物名称	引物序列
Genes name	Primers name	Primers sequence (5'→3')
<i>pyrF</i>	L2F4	CCTAGCCCAACTGCACAAGA
	L2R4	CGTGAGTTTAGCCACCGGAT
<i>pyrG</i>	NLG-F3	AGATGTCCAACAGAAGGGCG
	NLG-R3	GTTGACAACCGTGATGGTGC

复5次后^[24], 放在显微镜上检查, 挑出无锁状联合的菌丝体备用, 淘汰有锁状联合的菌丝体。

将无锁状联合的菌丝体接种于 MM、MMU、MMUF 不同培养基进行培养, 挑选出能在 MMU 和 MMUF 上生长但在 MM 上不生长的单孢子, 即为尿嘧啶营养缺陷型单孢子萌发的菌丝体。

1.8 灵芝尿嘧啶营养缺陷型单孢子的交配

将尿嘧啶营养缺陷型单孢萌发菌株配对在 MMU 培养基上进行杂交。杂交菌丝融合后, 挑出融合处菌丝进行镜检, 有锁状联合的为尿嘧啶营养缺陷型双核体菌株。

1.9 灵芝尿嘧啶营养缺陷型双核体菌株的生长速度测定

PDA 平板上的生长速度: 将灵芝尿嘧啶营养缺陷型双核体菌株接种于 PDA 平板上, 25 °C 培养。当菌丝开始萌发时, 在菌丝的前端画线当作菌丝的生长起始线, 6 d 后划第二条线, 测量距离, 计算日均生长速度, 3 个重复。PDAU 平板上的生长速度: 将灵芝尿嘧啶营养缺陷型双核体菌株分别接种于含有 0.005 6、0.011 2、0.022 4 g/L 尿嘧啶的 PDA 平板上, 并且采用上述相同的培养方法和测量方法, 测量生长速度。

2 结果与分析

2.1 灵芝 80 菌株原生质体紫外致死试验

灵芝 80 原生质体细胞在再生平板培养基 (PDMS) 上的再生率 (萌发菌落个数/涂布细胞个数)^[21] 为 0.566 7%, 随着紫外照射时间的逐渐增加, 原生质体的存活率逐渐降低, 紫外照射 25 s 后的原生质体的存活率为 0。根据图 1 可计算出灵芝 80 原生质体的半致死紫外照射时间为 8.7 s。

2.2 灵芝尿嘧啶营养缺陷型菌株的筛选和验证

对灵芝 80 原生质体采用 8.7 s 的紫外照射后, 经过 5 次再生筛选平板培养基的筛选, 最终获得 8 株表型上符合尿嘧啶营养缺陷型的菌株: 80-1、80-2、80-3、80-6、80-8、80-26、80-64 和 80-108。

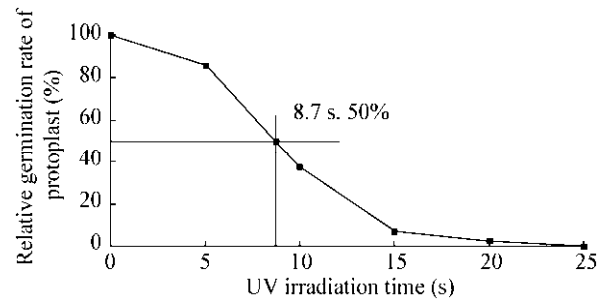


图 1 灵芝 80 菌株原生质体在紫外照射下的相对萌发率

Figure 1 Relative germination rate of the protoplast of *G. lucidum* strain 80 under treatment with UV irradiation

将得到的突变体菌株分别接种于 MM、MMU 和 MMUF 培养基上, 这些尿嘧啶营养缺陷型菌株可以在 MMU 和 MMUF 培养基上生长, 不能在 MM 培养基上生长, 典型结果如图 2 所示。

2.3 灵芝尿嘧啶营养缺陷型菌株的分子鉴定

提取灵芝尿嘧啶营养缺陷型单核体菌株基因组 DNA 进行 *pyrF* 和 *pyrG* 基因的 PCR 检测, 切胶回收后进行测序分析。通过对尿嘧啶合成途径中的 *pyrF* 和 *pyrG* 基因的分子检测发现, 突变可以分为 3 种情况, 包括碱基缺失、碱基变换和碱基插入 (表 2)。这些插入和点突变可能导致基因编码的蛋白功能失去活性, 产生尿嘧啶营养缺陷型菌株。

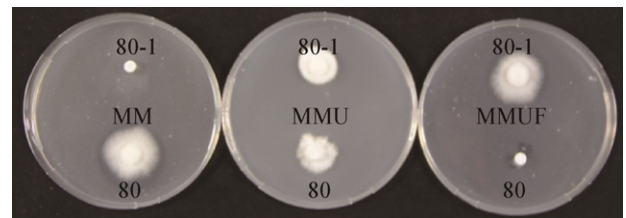


图 2 尿嘧啶营养缺陷型单核体菌株 80-1 与 80 在不同培养基上的生长情况

Figure 2 The growth of the uracil auxotrophic monokaryon 80-1 of *G. lucidum* and *G. lucidum* strain 80 on different medium

表 2 突变菌株的 *pyrF* 和 *pyrG* 基因与野生型菌株基因序列比对Table 2 The sequence alignment of *pyrF* or *pyrG* mutants compared with wild type strain

菌株 Strains	基因变化 Genic changes	氨基酸序列变化 Amino acid sequence changes
80-1	<i>pyrG</i> : 基因第 687 位 G 缺失 <i>pyrG</i> : g. 687 del	第 193 位以后氨基酸序列混乱 Frameshift mutation after the 193rd amino acid
80-2	<i>pyrF</i> : 基因 440-441 位 CC 碱基缺失 <i>pyrF</i> : g. 440-441 del	第 122 位氨基酸以后氨基酸序列混乱 Frameshift mutation after the 122nd amino acid
80-3	<i>pyrF</i> : 基因 386-392 位碱基片段缺失 <i>pyrF</i> : g. 386-392 del	第 104 位氨基酸以后氨基酸序列混乱 Frameshift mutation after the 104th amino acid
80-6	<i>pyrF</i> : 基因第 544-545 位碱基 GG→AA <i>pyrF</i> : g. 544-545 GG>AA	第 158 位氨基酸 G→N (GGC→AAC) The 158th amino acid G>N (GGC>AAC)
80-8	<i>pyrG</i> : 基因 332 位 G→A <i>pyrG</i> : g. 332 G>A	第 93 位氨基酸 D→N (GAC→AAC) The 93rd amino acid D>N (GAC>AAC)
80-26	<i>pyrG</i> : 基因 777 位 C→T <i>pyrG</i> : g. 777 C>T	终止密码(CGA→TGA) Termination codon mutation: CGA>TGA
80-64	<i>pyrF</i> : 基因 301-302 位 GG→AA <i>pyrF</i> : g. 301-302 GG>AA	第 77 位氨基酸 G→N (GGC→AAC) The 77th amino acid G>N (GGC>AAC)
80-108	<i>pyrF</i> : 基因第 483 与第 484 位之间插入 C、 第 526 位与 527 位之间插入 CG <i>pyrF</i> : g. 483-484 ins C, g. 526-527 ins CG	第 138 至 146 位氨基酸混乱, 147 位终止 Frameshift mutation from the 138th to 146th amino acids, the 147th amino acid termination codon

2.4 出菇

将灵芝尿嘧啶营养缺陷型单核体菌株 80-2、80-3 和 80-108 (*A1B1*)分别与可亲和的野生型单核体菌株 214 (*A2B2*)杂交获得 3 株杂交菌株 SLN2、SLN3 和 SLN8, 这 3 株菌在合适的栽培条件下均能够生长出子实体(图 3 为 SLN3 出菇情况)。



图 3 灵芝杂交菌株 SLN3 的出菇情况

Figure 3 Fruiting body formation of *G. lucidum* strain SLN3

2.5 灵芝的单孢分离及单核菌丝群体的建立

杂交菌株 SLN8 因为子实体鹿角化未能收集到担孢子, 另外两株杂交菌株 SLN2 和 SLN3 均收集到担孢子。将孢子稀释涂布于 PDAUF 选择培养基上培养, 随机挑取 SLN2 孢子再生菌株 89 株以及 SLN3 孢子再生菌株 75 株。在 PDAU 培养基上经过 5 次转接后置于显微镜下检查, 获得没有锁状联合的单核体菌株 83 株, 其中 SLN2 孢子单核体菌株为 31 株, SLN3 孢子单核体菌株为 52 株。这些尿嘧啶营养缺陷型单核体菌株能在 MMU 和 MMUF 上生长, 但在 MM 上不能生长(图 4)。

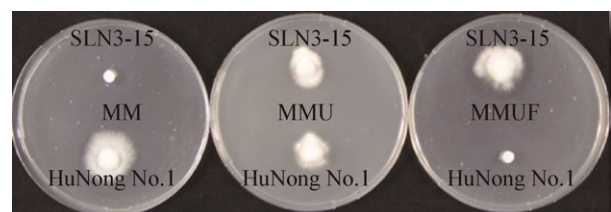


图 4 尿嘧啶营养缺陷型单核体菌株 SLN3-51 与沪农灵芝 1 号在不同培养基上的生长情况

Figure 4 The growth of the uracil auxotrophic monokaryon SLN3-51 of *G. lucidum* and *G. lucidum* strain HuNong No.1 on different medium

2.6 尿嘧啶营养缺陷型单孢子的交配

SLN2 和 SLN3 衍生的尿嘧啶营养缺陷型单孢菌株中各随机选取 1 株与 19 株分别进行两两配对。培养 1 周左右, 挑出杂交融合处菌丝进行镜检, 有锁状联合的判定为尿嘧啶营养缺陷型双核菌丝。最终从 SLN2 亲本得到金针菇尿嘧啶营养缺陷型自交双核体菌株 5 个(命名为 UL6、UL8、UL11、UL13 和 UL17), 从 SLN3 亲本获得杂交菌株 2 个(命名为 UL26 和 UL40)。

2.7 灵芝尿嘧啶营养缺陷型纯合体的 5-FOA 验证

将杂交得到的 7 株灵芝尿嘧啶营养缺陷型双核体菌株(UL6、UL8、UL11、UL13、UL17、UL26 和 UL40)分别接种于 MM、MMU、MMUF 培养基上, 这些杂交菌株可以在 MMU 培养基和 MMUF 培养基上生长而不能在 MM 培养基上生长, 典型结果如图 5 所示。

2.8 灵芝尿嘧啶营养缺陷型菌株的生长速度测定

将上述 7 株灵芝尿嘧啶营养缺陷型双核体菌株接种于 PDA 培养基和含有不同浓度尿嘧啶的 PDAU 培养基, 待菌丝萌发, 6 d 后开始测量生长情况。

结果如图 6 所示, 7 株灵芝尿嘧啶缺陷型菌株在 PDA 培养基上的生长速度平均为 1.87 mm/d, 远低于野生型沪农灵芝 1 号 4.56 mm/d。灵芝尿嘧啶缺陷型菌株在添加了尿嘧啶的 PDAU 培养基上的生长速度与 PDA 培养基相比都有不同程度的提高。UL6 在尿嘧啶添加量为 0.011 2 g/L 时

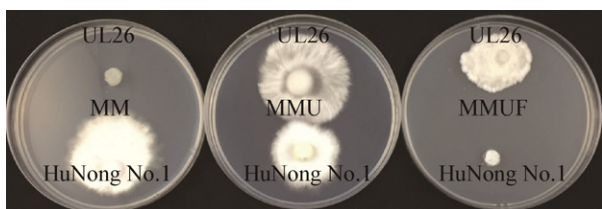


图 5 尿嘧啶营养缺陷型双核体菌株 UL26 与沪农灵芝 1 号在不同培养基上的生长情况

Figure 5 The growth of the uracil auxotrophic dikaryons UL26 of *G. lucidum* and *G. lucidum* strain HuNong No.1 on different medium

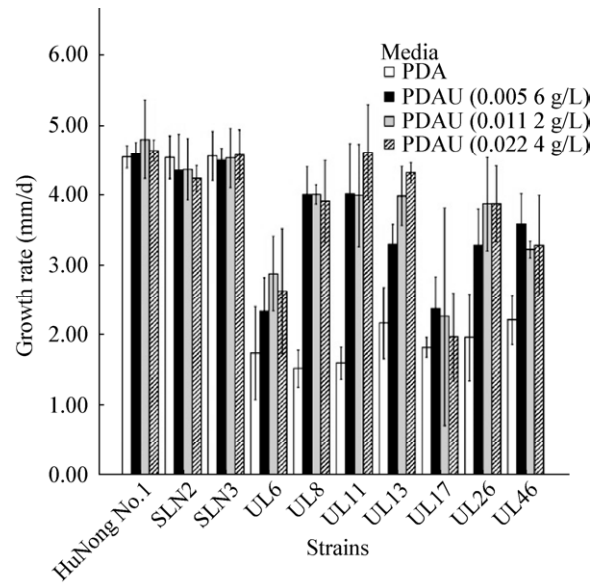


图 6 灵芝尿嘧啶营养缺陷型双核体菌株在含有不同尿嘧啶浓度的 PDA 培养基上的生长速度

Figure 6 Growth rate of uracil auxotrophic dikaryotic strains of *G. lucidum* on PDA and PDAU media

生长速度最快, UL8 添加不同浓度尿嘧啶后生长速度几乎一致, UL11、UL13 在尿嘧啶添加量为 0.022 4 g/L 时生长速度最快, 且与野生型生长速度相似。UL17、UL40 在尿嘧啶添加量为 0.005 6 g/L 时生长速度最快, 表明不同菌株最适生长对尿嘧啶的需要量不同。而野生型沪农灵芝 1 号和杂合子 SLN2、SLN3 在添加尿嘧啶 PDA 的培养基上生长速度与在 PDA 培养基上没有太大变化。可见尿嘧啶作为一种外源营养物质有助于提高灵芝尿嘧啶营养缺陷型菌株的生长速度, 进一步增大杂交菌株筛选数量有望获得产量显著提高的尿嘧啶营养缺陷型双核菌株。

3 讨论与结论

营养缺陷型菌株在科学研究领域有重要作用, 可作为标记菌种研究代谢途径和遗传规律以及进行育种。在细胞融合的研究中, 营养缺陷型突变体常被用作融合亲本以便检出融合子^[25]。另外, 营养缺陷型作为遗传标记可以应用于基因工程研究, 为基因组研究提供良好平台。Tripathi 等^[26]

在热纤维梭菌 *Clostridium thermocellum* 中以 *pyrF* 基因突变菌株为基础构建了转化体系。陆浩等^[27]构建了基于尿嘧啶磷酸核糖转移酶为负向筛选标记的生酮古龙酸杆菌基因组无痕修饰系统, 在尿嘧啶磷酸核糖转移酶基因(*upp*) (在灵芝中为 *pyrF* 基因)缺失的底盘细胞基础上通过两次同源重组实现了基因组的无痕修饰。突变株可以在 5-氟尿嘧啶培养基上生长, 野生型和回补菌株不能生长。张大成等^[28]首先敲除毕赤酵母 X-33 的 *URA3* 基因 (在灵芝中为 *pyrG* 基因), 获得了尿嘧啶营养缺陷型菌株, 然后用 *URA3* 作为选择标记, 构建了 *OCHIP* 基因敲除菌株。Chen 等^[29]构建了适用于蛹虫草以尿嘧啶合成的关键酶基因 *RUA3* (在灵芝中为 *pyrG* 基因)为负向筛选标记的 CRISPR-Cas9 基因编辑系统。蛹虫草 *URA3* 突变子在未添加尿苷的 PDA 培养基上也能生长, Chen 等^[29]认为 *URA3* 基因或许并非蛹虫草细胞生长所必需的基因。实际上突变子的生长可能与其选用的 PDA 培养基有关。本试验中筛选得到的突变子同样可以在 PDA 上生长, 但是在 MM 培养基上完全无法生长。在 PDA 培养基制备中用到的马铃薯中含有痕量尿嘧啶, 从而导致尿嘧啶缺陷型菌株的背景生长。在以尿嘧啶合成的关键酶基因为负向筛选标记或以尿嘧啶缺陷型为出发菌株的实验中需要注意选用不含尿嘧啶的基本培养基作为最终的筛选培养基。

灵芝因其单核体无法出菇, 在应用中会受到限制。通过单自交得到尿嘧啶营养缺陷型双核体菌株, 这些菌株保持了良好的继代稳定性, 可以作为分子生物学研究的宿主菌株, 为灵芝遗传育种研究提供材料。这些突变株在不含尿嘧啶添加物的基本培养基中无法正常生长, 在 PDA 培养基上的生长速度低于野生型菌株, 在添加尿嘧啶的 PDAU 培养基上可以不同程度地恢复正常生长, 这与香菇^[30]中的研究报道相一致, 表明尿嘧啶营养缺陷型菌株通过表型的差异可以得到区分, 这为利用尿嘧啶营养缺陷型菌株的表型和基因型进行菌种鉴别提

供了技术基础, 为进一步开发利用灵芝尿嘧啶营养缺陷型菌株提供了方法学上的指导。

REFERENCES

- [1] Zhang XY, Yang CQ. The chemical composition and pharmacological action of *Ganoderma lucidum*[J]. World Phytomedicines, 2006, 21(4): 152-155 (in Chinese)
张晓云, 杨春清. 灵芝的化学成分和药理作用[J]. 国外医药·植物药分册, 2006, 21(4): 152-155
- [2] Liu YP, Zhang ZS, Li YM, et al. The research progress of the hypoglycemic mechanism of *Ganoderma lucidum* polysaccharide[J]. Food Research and Development, 2018, 39(2): 215-218 (in Chinese)
刘亚萍, 张泽生, 李雨蒙, 等. 灵芝多糖降血糖机制的研究进展[J]. 食品研究与开发, 2018, 39(2): 215-218
- [3] Zhang HB, Shi SS, Chen CM. Research progress in anti-tumor immune mechanism of *Ganoderma lucidum* polysaccharides[J]. Medical Recapitulate, 2016, 22(2): 259-262 (in Chinese)
张华斌, 石松生, 陈春美. 灵芝多糖抗肿瘤免疫机制的研究进展[J]. 医学综述, 2016, 22(2): 259-262
- [4] Lv CT, Yao XY, Sun C. Progress of researches on main active substances and pharmacology of *Ganoderma lucidum*[J]. Anhui Agricultural Science Bulletin, 2011, 17(1): 50-51,94 (in Chinese)
吕超田, 姚向阳, 孙程. 灵芝主要活性物质及其药理作用研究进展[J]. 安徽农学通报, 2011, 17(1): 50-51,94
- [5] Ye PF, Zhang MP, Wang KY, et al. Progress of researches on main constituent and pharmacology of *Ganoderma lucidum*[J]. Edible and Medicinal Mushrooms, 2013, 21(3): 158-161 (in Chinese)
叶鹏飞, 张美萍, 王康宇, 等. 灵芝主要成分及其药理作用的研究进展综述[J]. 食用菌, 2013, 21(3): 158-161
- [6] Wang WH, Jia W, Zhang JS, et al. Advances in studies on mechanisms of anti-prostate cancer property of *Ganoderma lucidum*[J]. Acta Edulis Fungi, 2018, 25(1): 107-112 (in Chinese)
汪雯翰, 贾薇, 张劲松, 等. 灵芝对前列腺癌的作用机理[J]. 食用菌学报, 2018, 25(1): 107-112
- [7] Wang HY, Wang L, Xie KP, et al. The antimicrobial and antioxidant activity of the powder of *Ganoderma lucidum*[J]. Chinese Journal of Biochemical Pharmaceutics, 2017, 37(3): 52-54 (in Chinese)
王红岩, 汪璐, 谢鲲鹏, 等. 灵芝全粉的抑菌作用和抗氧化作用[J]. 中国生化药物杂志, 2017, 37(3): 52-54
- [8] Kim S, Song J, Choi HT. Genetic transformation and mutant isolation in *Ganoderma lucidum* by restriction enzyme-mediated integration[J]. FEMS Microbiology Letters, 2004, 233(2): 201-204
- [9] Shi L, Fang X, Li MJ, et al. Development of a simple and efficient transformation system for the basidiomycetous medicinal fungus *Ganoderma lucidum*[J]. World Journal of

- Microbiology and Biotechnology, 2012, 28(1): 283-291
- [10] Li G, Li RX, Liu QY, et al. A highly efficient polyethylene glycol-mediated transformation method for mushrooms[J]. FEMS Microbiology Letters, 2006, 256(2): 203-208
- [11] Xin YH, Xiao ZY, You LF, et al. Heterologous expression of taxadiene synthase gene in *Ganoderma lucidum*[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2014, 47(3): 546-552 (in Chinese)
辛燕花, 肖招燕, 尤琳烽, 等. 紫杉二烯合酶基因在灵芝中的表达[J]. 中国农业科学, 2014, 47(3): 546-552
- [12] Sun MK, Zhang M, Tian J, et al. Construction of an overexpression vector containing LZ-8 gene and transformation of *Ganoderma lingzhi* protoplasts[J]. Mycosystema, 2017, 36(12): 1625-1631 (in Chinese)
孙墨可, 张曼, 田娟, 等. 真菌免疫调节蛋白基因 LZ-8 过表达载体的构建及转化灵芝原生质体的研究[J]. 菌物学报, 2017, 36(12): 1625-1631
- [13] Zhang XT, Han C, Wu LY, et al. Preparation and regeneration of the protoplasts from *Ganoderma lucidum* and their transformation[J]. Hereditas (Beijing), 2001, 23(5): 458-462 (in Chinese)
张新涛, 韩春, 吴立宇, 等. 灵芝原生质体的分离及其转化[J]. 遗传, 2001, 23(5): 458-462
- [14] Sun L, Cai HQ, Xu WH, et al. Efficient transformation of the medicinal mushroom *Ganoderma lucidum*[J]. Plant Molecular Biology Reporter, 2001, 19(4): 383-384
- [15] Lei W, Liu X. Selectable marker-free technique and food safety of transgenic plants[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2009, 9(5): 157-164 (in Chinese)
雷桅, 刘昕. 无选择标记技术与转基因植物食品安全性[J]. 中国食品学报, 2009, 9(5): 157-164
- [16] Li WF, Ji J, Wang G, et al. Strategies on the safety of selectable marker genes in transgenic plant[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2010, 43(9): 1761-1770 (in Chinese)
李文凤, 季静, 王罡, 等. 提高转基因植物标记基因安全性策略的研究进展[J]. 中国农业科学, 2010, 43(9): 1761-1770
- [17] Tian Y, Chai WW, Bao AK, et al. Research progress of biosafety selectable marker genes[J]. Plant Physiology Journal, 2017, 53(3): 352-362 (in Chinese)
田野, 柴薇薇, 包爱科, 等. 生物安全型选择标记基因及其应用研究进展[J]. 植物生理学学报, 2017, 53(3): 352-362
- [18] Hu LQ, Pan YJ. The research situation of molecular transformation of edible fungi[J]. Edible Fungi of China, 2006, 25(4): 7-10 (in Chinese)
胡乐琴, 潘迎捷. 食用菌分子转化研究状况[J]. 中国食用菌, 2006, 25(4): 7-10
- [19] O'Donovan GA, Neuhaud J. Pyrimidine metabolism in microorganisms[J]. Bacteriological Reviews, 1970, 34(3): 278-343
- [20] Chen SL, Xu J, Liu C, et al. Genome sequence of the model medicinal mushroom *Ganoderma lucidum*[J]. Nature Communications, 2012, 3: 913
- [21] Wang LH, Mao WJ, Bao DP. Selected and molecular verification for uracil auxotrophic mutants of *Lentinula edodes*[J]. Acta Agriculturae Shanghai, 2014, 30(3): 6-9 (in Chinese)
王连会, 茅文俊, 鲍大鹏. 香菇尿嘧啶营养缺陷型菌株的筛选与分子验证[J]. 上海农业学报, 2014, 30(3): 6-9
- [22] Lu XZ, Wan JN, Mao WJ, et al. Screening and molecular verification of uracil auxotrophic mutants of *Flammulina velutipes*[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2017, 44(3): 495-503 (in Chinese)
卢绪志, 万佳宁, 茅文俊, 等. 金针菇尿嘧啶营养缺陷型菌株的筛选与分子鉴定[J]. 园艺学报, 2017, 44(3): 495-503
- [23] Zhang H, Qin LH, Tan Q, et al. Extract genomic DNA from *Lentinula edodes* using CTAB method[J]. Journal of Shanghai University (Natural Science), 2006, 12(5): 547-550 (in Chinese)
张红, 秦莲花, 谭琦, 等. 用改进的 CTAB 法提取香菇基因组[J]. 上海大学学报: 自然科学版, 2006, 12(5): 547-550
- [24] Cao H, Huang RZ. Cross-breeding of polyspora in *Flammulina velutipes*[J]. Edible Fungi, 1993, 15(6): 6-7 (in Chinese)
曹晖, 黄瑞贞. 金针菇担孢子多孢混合杂交育种[J]. 食用菌, 1993, 15(6): 6-7
- [25] Chen XL, Fan MZ, Li ZZ. Isolation of auxotrophic mutants of G106, a strain of *Paecilomyces gunnii* var. *minor*, the anamorph of *Cordyceps gunnii* var. *minor*[J]. Journal of Anhui Agricultural University, 2002, 29(2): 166-168 (in Chinese)
陈晓琳, 樊美珍, 李增智. 一种虫草无性型营养缺陷型的诱变筛选[J]. 安徽农业大学学报, 2002, 29(2): 166-168
- [26] Tripathi SA, Olson DG, Argyros DA, et al. Development of *pyrF*-based genetic system for targeted gene deletion in *Clostridium thermocellum* and creation of a *pta* mutant[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2010, 76(19): 6591-6599
- [27] Lu H, Li TM, Liu JL, et al. Construction of a marker-free deletion system based on the uracil phosphoribosyl transferase gene as a negative selection marker in *Ketogulonigenium vulgare*[J]. Food Science, 2017, 38(4): 39-44 (in Chinese)
陆浩, 李天明, 刘金雷, 等. 基于尿嘧啶磷酸核糖转移酶为负向筛选标记的生酮古龙酸杆菌基因组无痕修饰系统的构建[J]. 食品科学, 2017, 38(4): 39-44
- [28] Zhang DC, Xu YL, Xin X, et al. *Pichia pastoris* X-33 with *OCH1* gene deletion and its expression of glycoprotein GM-CSF[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2011, 51(5): 622-629 (in Chinese)
张大成, 许永利, 辛鑫, 等. 毕赤酵母 X-33 *OCH1* 基因敲除菌株的构建及其表达低糖基化蛋白 GM-CSF[J]. 微生物学报, 2011, 51(5): 622-629
- [29] Chen BX, Wei T, Ye ZW, et al. Efficient CRISPR-Cas9 gene disruption system in edible-medicinal mushroom *Cordyceps militaris*[J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9: 1157
- [30] Zhou CL, Xi LP, Mao WJ, et al. Establishment of uracil auxotrophic dikaryotic strains of *Lentinula edodes* by crossbreeding[J]. Breeding Science, 2017, 67(2): 135-139